

嗜酸乳杆菌抗酸抗胆汁盐能力的研究^{*}

赵瑞香¹, 孙俊良¹, 李元瑞², 袁志发²

(1 河南职业技术师范学院 食品学院, 河南 新乡 453003; 2 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用MRS培养基, 模拟人体胃酸环境(pH 1.5~4.5)和十二指肠高胆汁盐环境(1~4 g/kg)对嗜酸乳杆菌的抗性进行了研究。结果表明, 嗜酸乳杆菌在pH 2.5~4.5时具有较强的生存能力, 37℃培养6 h活菌数仍达 10^7 mL^{-1} 以上, pH 1.5条件下仍有部分存活。在1~3 g/kg胆汁盐条件下培养4 h, 活菌数仍达 10^6 mL^{-1} 以上, 且能在4 g/kg胆汁盐中存活。回归分析的 F 检验值达极显著水平。

[关键词] 嗜酸乳杆菌; 胃肠环境; 抗性; 回归分析

[中图分类号] Q 93

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)02-0057-04

近几年来, 随着人们健康意识的逐步增强, 微生物制剂及生物活性食品市场十分活跃, 品种也越来越多, 但这些微生物在人体内的存活能力高低直接关系到其健康促进作用的正常发挥, 也是检验产品质量的关键指标之一。嗜酸乳杆菌作为人体肠道中的重要微生物, 与人体健康息息相关^[1,2], 是目前乳酸菌家族中具有较高研究与开发价值的益生菌, 被视为第三代酸乳发酵剂菌种^[3]。据报道^[4], 胃液pH值因饮食结构不同而波动很大, 通常pH值为3左右, 空腹或食用酸性食品时pH可达1.5, 食用碱性食物pH可达4~5, 食物通过时间为1~2 h。十二指肠中胆汁盐含量为0.3~3 g/kg, 食物通过的时间相对极短, 可见胃肠为高酸高胆汁盐环境。嗜酸乳杆菌食入人体后, 能否顺利通过胃肠环境是决定其发挥功能特性的关键因素。为此, 本研究采用MRS培养基, 模拟正常人体胃液低pH和十二指肠高胆汁盐的状态, 探讨*Lactobacillus acidophilus* Ind-I和*Lactobacillus acidophilus* L acid 在其中的存活能力, 以为肠道中嗜酸乳杆菌健康作用的正常发挥提供理论依据, 也为其产品的开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

菌种 *Lactobacillus acidophilus* Ind-I (简称

L a-1) 和 *Lactobacillus acidophilus* L acid (简称 L a-2), 来源于波兰罗兹技术大学食品化学与生物工程学院发酵工程与工业微生物系。

MRS 液体培养基^[5]。

1.2 方 法

耐酸能力测定 用0.1 mol/L HCl, 将MRS液体培养基pH值分别调为1.5, 2.5, 3.5和4.5, 121℃灭菌15 min后, 在超净工作台上接种活化的体积分数10%的嗜酸乳杆菌种子液, 于37℃恒温培养, 每隔2 h, 采用无菌生理盐水以10倍依次递减稀释, 进行平板菌落计数^[6], 测定0~6 h的活菌变化情况, 重复2次。

耐胆汁盐能力测定 用猪胆汁盐, 将MRS液体培养基胆汁盐含量分别调为1, 2, 3, 4 g/kg, 于121℃灭菌15 min。在超净工作台上, 将活化的体积分数10%的嗜酸乳杆菌培养液接种于MRS-胆汁盐培养基中, 37℃培养, 每隔1 h, 采用无菌生理盐水以10倍递减依次稀释, 进行平板菌落计数^[6], 测定0~4 h活菌数的变化情况, 重复2次。

2 结果与分析

2.1 低pH值条件下嗜酸乳杆菌的存活能力

嗜酸乳杆菌食入人体后, 首先要抵御胃酸环境。采用MRS培养基模拟胃酸环境(pH 1.5~4.5), 测

* [收稿日期] 2003-05-15

[基金项目] 河南职业技术师范学院重点科研项目(02010505)

[作者简介] 赵瑞香(1966-), 女, 河南长垣人, 博士, 主要从事食品发酵微生物研究。

得 0~ 6 h 活菌数的变化情况见表 1。

表 1 pH 对 L a-1, L a-2 活菌数的影响

Table 1 Influence of pH on the living bacterial number of L a-1 and L a-2

mL⁻¹

时间/h Time	处理 Treatment	pH							
		4 5		3 5		2 5		1 5	
		L a-1	L a-2	L a-1	L a-2	L a-1	L a-2	L a-1	L a-2
0	I	1.28 × 10 ⁸	2.02 × 10 ⁹	1.28 × 10 ⁸	2.02 × 10 ⁹	1.28 × 10 ⁸	2.02 × 10 ⁹	1.28 × 10 ⁸	2.02 × 10 ⁹
	II	1.66 × 10 ⁸	3.72 × 10 ⁹	1.66 × 10 ⁸	3.72 × 10 ⁹	1.66 × 10 ⁸	3.72 × 10 ⁹	1.66 × 10 ⁸	3.72 × 10 ⁹
	$\bar{X}$	1.47 × 10 ⁸	2.87 × 10 ⁹	1.47 × 10 ⁸	2.87 × 10 ⁹	1.47 × 10 ⁸	2.87 × 10 ⁹	1.47 × 10 ⁸	2.87 × 10 ⁹
2	I	2.40 × 10 ⁹	4.48 × 10 ⁸	1.68 × 10 ⁸	7.60 × 10 ⁸	1.18 × 10 ⁸	4.34 × 10 ⁸	4.58 × 10 ⁴	5.23 × 10 ⁴
	II	1.34 × 10 ⁹	3.88 × 10 ⁸	1.08 × 10 ⁸	9.60 × 10 ⁸	1.02 × 10 ⁸	3.12 × 10 ⁸	3.24 × 10 ⁴	8.69 × 10 ⁴
	$\bar{X}$	1.87 × 10 ⁹	4.18 × 10 ⁸	1.38 × 10 ⁸	8.60 × 10 ⁸	1.10 × 10 ⁸	3.73 × 10 ⁸	3.91 × 10 ⁴	6.96 × 10 ⁴
4	I	7.00 × 10 ⁹	1.98 × 10 ⁹	2.24 × 10 ⁹	4.32 × 10 ⁸	4.60 × 10 ⁷	1.06 × 10 ⁸	5.96 × 10 ³	4.98 × 10 ⁴
	II	4.14 × 10 ⁸	2.54 × 10 ⁹	1.48 × 10 ⁹	4.58 × 10 ⁸	3.98 × 10 ⁷	1.64 × 10 ⁸	2.36 × 10 ³	4.56 × 10 ⁴
	$\bar{X}$	3.71 × 10 ⁹	2.26 × 10 ⁹	1.86 × 10 ⁹	4.45 × 10 ⁸	4.29 × 10 ⁷	1.35 × 10 ⁸	4.16 × 10 ³	4.77 × 10 ⁴
6	I	2.10 × 10 ¹⁰	1.54 × 10 ⁹	6.80 × 10 ⁸	4.50 × 10 ⁸	1.32 × 10 ⁷	4.56 × 10 ⁷	2.10 × 10 ³	6.35 × 10 ³
	II	2.38 × 10 ⁹	1.16 × 10 ⁹	4.88 × 10 ⁹	3.54 × 10 ⁸	1.30 × 10 ⁷	4.78 × 10 ⁷	1.92 × 10 ³	2.25 × 10 ³
	$\bar{X}$	1.17 × 10 ¹⁰	1.35 × 10 ⁹	2.78 × 10 ⁹	4.02 × 10 ⁸	1.31 × 10 ⁷	4.67 × 10 ⁷	2.01 × 10 ³	4.30 × 10 ³

从表 1 可以看出,在低 pH 情况下,L a-1 和 L a-2 具有较强的生存能力。37 经过 6 h 培养,在 pH 为 3.5、4.5 时,L a-1 活菌数不但没有下降,反而明显上升。pH 为 4.5 时,活菌数由 $1.47 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 增加到 $1.17 \times 10^{10} \text{ mL}^{-1}$,上升了 2 个对数级;pH 为 3.5 时,活菌数由 $1.47 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 增加到 $2.78 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$,上升了 1 个对数级,且活菌数均达 10^9 mL^{-1} 以上。在 pH 为 4.5、3.5 时,37 培养 6 h,L a-2 活菌数略有下降,pH 为 4.5 时对数级未下降,pH 为 3.5 时仅下降了 1 个对数级,但活菌数均在 10^8 mL^{-1} 以上。pH 为 2.5 时,37 培养 6 h,L a-1 的存活率为 8.91%,L a-2 的存活率为 1.63%,且活菌数均达 10^7 mL^{-1} 以上。pH 为 1.5 时,经过 6 h 培养后大部分嗜酸乳杆菌死亡,但仍有部分存活,且培养 2 h 后的活菌数仍达 10^4 mL^{-1} 以上。Kummann 等^[7]报道,嗜酸乳杆菌产品发挥功能特性时活菌数的临界值为 10^6 mL^{-1} 或 10^6 个/g。通常胃酸的 pH 在 3 左右,流体食物在胃内停留时间为 1~ 2 h,对照研究结果表明,嗜酸乳杆菌活菌数远远超过了临界值。因此,L a-1, L a-2 具有较强的耐酸能力,能够顺利通过胃酸环境而到达肠内。

以表 1 中的时间(x_1)、pH(x_2)为自变量,以 L a-1 和 L a-2 活菌数(N_1 和 N_2)的均值为因变量,进行回归分析,可获得方程:

$$N_1 = 7.3720833516313 - 1.9375985500x_1 - 5.0283686700x_2 + 604.5494336500x_1x_2 + 114.8462304688x_1^2 + 771.0028293750x_2^2$$

(1)

$$N_2 = 3.4027341625000 - 1.4504965500x_1 - 609.98362500x_2 + 92.82463500x_1x_2 + 137.3060468750x_1^2 + 110.40135000x_2^2 \quad (2)$$

方程(1)、(2)的回归复相关系数分别为 0.929 和 0.908,决定系数分别为 0.864 和 0.824,回归方程的 F 检验值为 12.678^{**} 和 9.343^{**} ($F_{0.01}(5,10) = 5.64$)。

2.2 高胆汁盐条件下嗜酸乳杆菌的存活能力

已知人体小肠中胆汁盐含量为 0.3~ 3 g/kg,用猪胆汁盐模拟人体小肠胆汁盐环境,测得嗜酸乳杆菌在 MRS-胆汁盐培养基中 0~ 4 h 活菌数的变化情况见表 2。从表 2 可以看出,在 1 g/kg 胆汁盐条件下,37 培养 4 h 后,L a-1 的活菌数不但没有下降,反而有明显上升的趋势,其活菌数达 $1.09 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$;在 2 g/kg 条件下,其活菌数略有下降,达 $2.52 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,存活率为 24.71%;在 3 g/kg 条件下,1 h 时 L a-1 处于应激状态,活菌数迅速下降,其后逐渐增加,4 h 时活菌数为 $2.97 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,但仍处于健康促进特性的活菌数范围内。在胆汁盐分别为 1、2 g/kg 条件下,37 培养 4 h 后,L a-2 的活菌数略有下降,其存活率分别为 83.81% 和 23.05%,但活菌数仍达 10^8 mL^{-1} 以上;在胆汁盐为 3 g/kg 时,L a-2 活菌数达 $1.28 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。同时,在 4 g/kg 条件下,L a-1, L a-2 均有部分存活。Kummann 等^[7]报道,嗜酸乳杆菌产品发挥功能特性的活菌数临界值为 10^6 mL^{-1} 或 10^6 个/g。在小肠正常胆汁盐条件下(0.3~ 3 g/kg),由于食物在小肠内不停留,因此,嗜酸乳杆菌具有较强的抗胆汁盐能力,能顺利通过小肠而到达大肠。

表 2 胆汁盐对 L a-1、L a-2 活菌数的影响

Table 2 Influence of bile salt on the living bacterial number of L a-1 and L a-2		mL ⁻¹							
时间/h Time	处理 Treatment	胆汁盐/(g · kg ⁻¹) Bile salt							
		1		2		3		4	
		L a-1	L a-2	L a-1	L a-2	L a-1	L a-2	L a-1	L a-2
0	I	1.38 × 10 ⁹	1.08 × 10 ⁹	1.38 × 10 ⁹	1.08 × 10 ⁹	1.38 × 10 ⁹	1.08 × 10 ⁹	1.38 × 10 ⁹	1.08 × 10 ⁹
	II	6.60 × 10 ⁸	1.02 × 10 ⁹	6.60 × 10 ⁸	1.02 × 10 ⁹	6.60 × 10 ⁸	1.02 × 10 ⁹	6.60 × 10 ⁸	1.02 × 10 ⁹
	$\bar{X}$	1.02 × 10 ⁹	1.05 × 10 ⁹	1.02 × 10 ⁹	1.05 × 10 ⁹	1.02 × 10 ⁹	1.05 × 10 ⁹	1.02 × 10 ⁹	1.05 × 10 ⁹
1	I	2.24 × 10 ¹⁰	7.20 × 10 ⁸	1.32 × 10 ⁸	1.76 × 10 ⁹	8.60 × 10 ⁵	6.40 × 10 ⁶	1.28 × 10 ⁵	2.62 × 10 ³
	II	1.38 × 10 ¹⁰	1.04 × 10 ⁹	1.10 × 10 ⁸	2.04 × 10 ⁹	7.60 × 10 ⁵	8.40 × 10 ⁶	5.05 × 10 ⁵	1.74 × 10 ³
	$\bar{X}$	1.81 × 10 ¹⁰	8.80 × 10 ⁸	1.21 × 10 ⁸	1.90 × 10 ⁹	8.10 × 10 ⁵	7.40 × 10 ⁶	3.17 × 10 ⁵	2.18 × 10 ³
2	I	2.18 × 10 ⁹	1.64 × 10 ⁹	4.50 × 10 ⁸	9.60 × 10 ⁸	7.00 × 10 ⁶	1.22 × 10 ⁷	6.40 × 10 ⁴	2.09 × 10 ³
	II	2.84 × 10 ⁹	1.92 × 10 ⁹	6.34 × 10 ⁸	7.40 × 10 ⁸	5.60 × 10 ⁶	9.20 × 10 ⁶	6.60 × 10 ⁴	1.89 × 10 ³
	$\bar{X}$	2.51 × 10 ⁹	1.78 × 10 ⁹	5.42 × 10 ⁸	8.50 × 10 ⁸	6.30 × 10 ⁶	1.07 × 10 ⁷	6.50 × 10 ⁴	1.99 × 10 ³
3	I	1.30 × 10 ⁹	1.30 × 10 ⁹	3.28 × 10 ⁸	3.46 × 10 ⁸	3.72 × 10 ⁶	2.26 × 10 ⁶	1.60 × 10 ³	1.86 × 10 ³
	II	1.20 × 10 ⁹	1.42 × 10 ⁹	2.70 × 10 ⁸	6.00 × 10 ⁸	2.82 × 10 ⁶	2.04 × 10 ⁶	2.20 × 10 ³	1.82 × 10 ³
	$\bar{X}$	1.25 × 10 ⁹	1.36 × 10 ⁹	2.99 × 10 ⁸	4.73 × 10 ⁸	3.27 × 10 ⁶	2.15 × 10 ⁶	1.90 × 10 ³	1.84 × 10 ³
4	I	1.22 × 10 ⁹	9.80 × 10 ⁸	2.48 × 10 ⁸	1.02 × 10 ⁸	3.12 × 10 ⁶	1.30 × 10 ⁶	1.00 × 10 ³	1.32 × 10 ³
	II	9.60 × 10 ⁸	7.80 × 10 ⁸	2.56 × 10 ⁸	3.82 × 10 ⁸	2.82 × 10 ⁶	1.26 × 10 ⁶	1.80 × 10 ³	1.22 × 10 ³
	$\bar{X}$	1.09 × 10 ⁹	8.80 × 10 ⁸	2.52 × 10 ⁸	2.42 × 10 ⁸	2.97 × 10 ⁶	1.28 × 10 ⁶	1.40 × 10 ³	1.27 × 10 ³

以表 2 中的时间(x_1)、胆汁盐(x_3)为自变量,以 L a-1 和 L a-2 活菌数(N_1 和 N_2)的均值为因变量,进行回归分析可得:

$$N_1 = 1\ 308\ 270\ 380\ 0 - 562\ 513\ 949\ 285\ 7x_1 - 7\ 698\ 457\ 970\ 0x_3 + 4\ 333\ 546\ 310\ 000\ 1x_1x_3 - 268\ 592\ 608\ 928\ 6x_1^2 + 108\ 615\ 177\ 000\ 0x_3^2 \quad (3)$$

$$N_2 = 1\ 982\ 690\ 402\ 714\ 3 - 86\ 193\ 291\ 428\ 6x_1 - 60\ 064\ 461\ 5x_3 - 577\ 968\ 340\ 0x_1x_3 + 13\ 260\ 795\ 357\ 1x_1^2 + 7\ 067\ 386\ 400\ 000\ 5x_3^2 \quad (4)$$

方程 (3), (4) 的回归复相关系数分别为 0.571 和 0.794, 决定系数为 0.326 和 0.630, 回归方程的 F 检验值为 1.356, 4.763^{**} ($F_{0.01}(5, 14) = 4.69$)。

3 讨 论

嗜酸乳杆菌具有高度适应环境的能力,对于不良环境能迅速作出自我调节反应,使其形成适应环境的代谢系统。为了进一步观察低 pH 值环境下嗜酸乳杆菌的形态,本研究对 L a-1、L a-2 进行涂片镜检,发现其在低 pH 值环境下菌体粗壮,两端钝圆,而高 pH 值环境菌体纤细,呈杆状,这可能是该菌为抵御不良环境而产生的一种适应性反应。顾瑞霞等^[8]研究表明,嗜热链球菌、保加利亚杆菌和双歧杆

菌在低 pH 值条件下 (pH 3), 采用 MRS 培养基,于最适生长温度培养 60 min, 3 种菌存活率几乎为零,而在 pH 值为 2 时, 20~ 40 min 3 种菌便全部死亡。对照本试验结果,说明供试嗜酸乳杆菌的耐酸能力较强,能够抵御胃酸环境,具备功能性食补因子的基本要求。

耐胆汁盐特性也是嗜酸乳杆菌作为功能性食补因子的一个重要优势指标,虽然在 3 g/kg 胆汁盐培养中 4 h, L a-1、L a-2 的活菌数减少了 100 倍,但仍达 10⁶ mL⁻¹ 以上。据报道^[9, 10], 为了防止疾病发生, 只有摄入 10⁶ mL⁻¹ 或 10⁶ g⁻¹ 以上的活性嗜酸乳杆菌, 才能充分发挥其健康促进特性, 因此, 供试嗜酸乳杆菌仍能抵抗来自胰腺的胆汁盐, 且由于食品在十二指肠中停留时间极短, 嗜酸乳杆菌能够顺利通过小肠而到达大肠。

总之, 在模拟胃肠环境条件下, 供试嗜酸乳杆菌可以顺利通过胃肠高酸、高胆汁盐环境而到达肠内, 其可以作为食补因子在人体肠道中正常繁殖, 形成优势菌, 充分发挥其健康促进特性, 起到整肠作用。该抗逆能力的研究为嗜酸乳杆菌应用于微生态制剂和生物活性食品奠定了理论基础。

[参考文献]

[1] Fuller R. Probiotics in human medicine[J]. Gut, 1991, 32: 439- 442
[2] Alm L. The therapeutic effects of various cultures—an overview [A]. Robinson R. K. Therapeutic Properties of Fermented Milks[C]. New York: Elsevier Applied Science, 1991. 45- 64
[3] 赵瑞香, 孙俊良. 发酵乳制品[J]. 中国乳品工业, 1999, (6): 26- 28

- [4] Hunger W, Peitersen N. New technical aspects of the preparation of starter culture[J]. Bulletin DF, 1992, 277: 17- 21.
- [5] 赵瑞香, 李元瑞, 罗 磊, 等. 嗜酸乳杆菌生产特性的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(3): 85- 88.
- [6] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [7] Kumann J A, Rasic J L. Technology of fermented special products[J]. Bulletin DF, 1988, 227: 101- 104.
- [8] 顾瑞霞, 谭东兴, 郭久和, 等. 胆汁盐和低pH 值对乳酸菌活性的影响[J]. 微生物学通报, 1996, 23(3): 144- 146.
- [9] Gilliland S E. Health and nutritional benefit from lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1990, 87: 175- 188.
- [10] Gilliland S E, Walker D K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in human[J]. Dairy Sci, 1990, 73: 905- 911.

Study on the intolerance ability of *Lactobacillus acidophilus* on pH and bile salt

ZHAO Rui-xiang¹, SUN Jun-liang¹, LI Yuan-rui², YUAN Zhi-fa²

(1 Food College, Henan Vocation-Technical Teachers College, Xinxiang, Henan 453003, China;

2 College of Food Science and Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Using MRS medium, the intolerance ability of *Lactobacillus acidophilus* was studied in imitating gastroenteric environments (pH 1.5- 4.5 and 1- 4 g/kg bile salt). The results showed that the survival ability of *L. acidophilus* was higher at pH 2.5- 4.5, the living bacterial number was above 10^7 cfu/mL after 6 h culture at 37 °C, and some *L. acidophilus* was still alive at pH 1.5; that the living bacterial number was above 10^6 cfu/mL at 1- 3 g/kg bile salt after 4 h culture and some bacteria could survive at 4 g/kg bile salt. The *F* inspection value was extremely remarkable by regression analysis.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; gastroenteric environment; intolerance ability; regression analysis

富铬南瓜新品种“永安 1 号”通过鉴定

由西北农林科技大学园艺学院蔬菜花卉研究所程永安副研究员主持选育的富铬南瓜新品种——“永安 1 号”于 2003 年 11 月 18 日通过由陕西省农作物品种审定委员会组织的专家鉴定。

该品种生长发育快, 座果节位低, 早熟性突出, 丰产性好, 产量较对照品种小磨盘增加 26.4%。果实为高扁圆形, 果实皮色墨绿色至桔黄色, 瓜肉黄色, 符合市场新的需求。尤其营养品质好, 富含对糖尿病有防治作用的铬元素, 在丰富富铬南瓜品种类型方面有积极作用。该品种耐低温、耐弱光, 抗病性优于对照品种小磨盘。适宜于早春保护地和露地栽培。可在陕西关中地区及同类生态地区推广种植。经陕西省农产品质量监督检验站品质分析, 水分 895.9 g/kg, 锌 1.89 mg/kg, 类胡萝卜素 73.1 mg/kg, 分别低于对照品种小磨盘 (925.8 g/kg, 2.98 mg/kg, 89.9 mg/kg), 总糖 42.75 g/kg, 淀粉 5.7 g/kg, 铬 0.893 mg/kg, 显著高于对照品种小磨盘 (31.0 g/kg, 2.4 g/kg, 0.238 mg/kg)。

经陕西省 12 个点次区域试验, 平均产量 38 019 kg/hm², 比对照品种小磨盘 (平均产量 30 094.5 kg/hm²) 增产 26.4%。9 个生产示范点平均产量为 33 090 kg/hm², 比对照品种小磨盘 (平均产量 27 621 kg/hm²) 增产 21.0%。

(屈李纯 供稿)